

## Deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) pada udang penaeid - Bagian 2: Metode histopatologi





© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Mangala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup .....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip .....	4
4 Peralatan.....	4
5 Bahan.....	4
6 Prosedur .....	4
7 Intepretasi hasil .....	6
Lampiran A (normatif) Pembuatan pereaksi .....	8
Lampiran B (informatif) Diagram alir dan bahan kimia yang diperlukan dalam proses jaringan pada <i>automatic tissue processor</i> .....	10
Lampiran C (informatif) Prosedur pewarnaan hematoxylene - eosin .....	11
Bibliografi .....	12



## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) pada udang penaeid- Bagian 2: Metode histopatologi.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas dalam rapat-rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 Juni 2010 di Bandung, dihadiri oleh anggota Subpanitia Teknis 65-05-S2 Perikanan Budidaya, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya serta telah memperhatikan:

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.PER.01/MEN/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Januari 2011 sampai dengan 25 Maret 2011 dengan hasil akhir RASNI.



## Deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) pada udang penaeid – Bagian 2: Metode histopatologi

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV) pada udang penaeid menggunakan metode histopatologi.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **badan inklusi intranukleus (*intranuclear inclusion body*)**

inti sel yang membesar karena adanya reaksi spesifik dari inti sel yang diakibatkan adanya penetrasi virus

#### 2.2

##### ***basofilik***

bagian sel yang mampu menyerap zat pewarna *hematoxylene* sehingga sel berwarna ungu atau biru

#### 2.3

##### ***clearing***

cara penjernihan dan pengeluaran sisa alkohol dari dalam sel/jaringan

#### 2.4

##### **diagnosa**

metode diagnosa yang diakui secara internasional

#### 2.5

##### ***dissecting set***

seperangkat alat bedah berfungsi untuk membedah contoh dan mencari organ target untuk pengamatan

#### 2.6

##### ***drying bench***

alat untuk mengeringkan dan melekatkan potongan jaringan pada *slide* yang diangkat dari *floating bath*

#### 2.7

##### ***embedding***

cara pencetakan organ dengan parafin (dengan titik didih 52 °C - 58 °C) untuk memudahkan pengaturan dalam pemotongan jaringan

#### 2.8

##### ***eosinofilik/asidofilik***

bagian sel yang mampu menyerap zat pewarna *eosin* sehingga berwarna merah

#### 2.9

##### **fiksasi**

cara pengawetan organ agar struktur sel dan jaringan tidak rusak paska kematian



**2.10**

**fiksatif**

larutan yang digunakan untuk mempertahankan jaringan tanpa menyebabkan perubahan strukturnya

**2.11**

***floating bath***

penangas air dengan suhu tertentu (40 °C - 45 °C) untuk meregangkan hasil pemotongan jaringan dari mikrotom

**2.12**

***hemolymph***

cairan darah yang bercampur limfe pada udang

**2.13**

***histo-embedder***

alat untuk pencetakan contoh dalam blok parafin setelah *infiltrasi* parafin

**2.14**

**histopatologi**

ilmu yang mempelajari perubahan abnormal sel jaringan tubuh

**2.15**

***hypertropi***

peningkatan ukuran dari suatu jaringan yang disebabkan oleh meningkatnya ukuran sel

**2.16**

***infiltrasi parafin***

cara penyusupan parafin ke dalam sel/jaringan yang dilangsungkan pada titik didih parafin (52 °C - 58 °C) untuk memudahkan pemotongan jaringan

**2.17**

***infectious myonecrosis virus (IMNV)***

IMNV diperkirakan adalah totivirus yang merupakan anggota dari *family* totiviridae

**2.18**

**jaringan**

kumpulan sel yang mempunyai struktur dan fungsi sama, yang menjadi objek pemeriksaan histopatologi

**2.19**

***karioreksis***

perubahan nukleus ditandai dengan adanya fragmentasi nukleus menjadi beberapa bagian kecil

**2.20**

***kromatin***

bagian inti sel yang lebih mudah terwarnai, membentuk suatu jaringan *fibril nuclear*

**2.17**

***mikrotom***

alat yang digunakan untuk memotong jaringan sesuai ketebalan yang diinginkan



**2.18****minyak *immersi***

minyak yang digunakan untuk memperbesar A.N (*Aperture Numerik*) sebagai faktor yang menentukan besarnya "*Airy Disc*" (besarnya layar) dan mempunyai hubungan langsung dengan kemampuan maksimum mikroskop dalam membedakan 2 buah titik terdekat secara terpisah

**2.19*****mounting***

menutup preparat dengan *cover glass* yang telah ditetesi perekat (*mounting agent*)

**2.20****organ target**

organ yang menjadi sasaran infeksi patogen (virus) dan digunakan sebagai objek pemeriksaan

**2.21****penyakit viral**

penyakit yang disebabkan oleh virus

**2.22*****piknotik***

adanya perubahan pada nukleus ditandai oleh adanya kondensasi kromatin nukleus menjadi suatu massa yang berwarna lebih gelap, homogen dan lebih kecil dari nukleus normal

**2.23****preparasi jaringan**

teknik pemotongan organ target untuk memudahkan pengamatan jaringan

**2.24****sel**

bagian terkecil penyusun jaringan yang mampu bermetabolisme dan menjadi objek dalam pemeriksaan penyakit dengan metoda histopatologik

**2.25*****staining set (staining jar)***

tempat pewarnaan irisan jaringan

**2.26*****syringe***

alat untuk menyuntikan cairan ke dalam atau menyedotnya dari berbagai pembuluh atau rongga

**2.27*****tissue processor***

alat dalam proses histopatologi bekerja secara *automatic* atau *manual* dipergunakan untuk memproses jaringan contoh untuk dehidrasi, *clearing* dan *infiltrasi* parafin

**2.28*****trimming***

teknik pemotongan blok parafin untuk mendapatkan bentuk yang memudahkan pemotongan sampel pada mikrotom, sehingga lebih efisien dan baik



### 3 Prinsip

Identifikasi IMNV pada jaringan udang penaeid dengan menggunakan metode histopatologi. Contoh yang diperiksa terlebih dahulu difiksasi, preparasi organ dan dilanjutkan dengan proses meliputi *dehidrasi*, *clearing*, *infiltrasi* parafin, *blocking*, pemotongan dengan mikrotom, pewarnaan, *mounting* kemudian diperiksa dengan mikroskop.

### 4 Peralatan

- a) alat bedah (*disecting set*);
- b) alat pemotong jaringan (mikrotom);
- c) alat untuk memproses jaringan (*tissue processor*);
- d) *drying bench*;
- e) *floating bath*;
- f) gelas penutup;
- g) gelas preparat;
- h) *histo-embedder*;
- i) masker;
- j) mikroskop;
- k) *paraffin mold*;
- l) sarung tangan;
- m) *staining set*.

### 5 Bahan

- a) akuades;
- b) asam asetat glasial;
- c) *cassette embedding*;
- d) *chloroform/ xylene/xylol*;
- e) *entellan*;
- f) *eosin yellowish*;
- g) etanol absolut (p.a);
- h) *etanol berseri* (50%; 70%; 80%; 90%)
- i) *fiksatif*;
- j) *formaldehyde* 37 %;
- k) *hematoxylene*;
- l) *soft paraffin crumble*;
- m) *hard paraffin*
- n) *xylol*.

**CATATAN** Pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran A.

### 6 Prosedur

#### 6.1 Fiksasi

1. Siapkan persediaan fiksatif secukupnya. Aturan secara umum sedikitnya 10 (sepuluh) volume fiksatif harus digunakan untuk 1 (satu) volume contoh jaringan (yaitu : 10 g contoh udang memerlukan 100 ml fiksatif); (apabila fiksatif yang digunakan *Davidson* setelah semalaman harus segera dinetralkan dengan formalin 10 %).
2. Lakukan fiksasi dengan perendaman dalam fiksatif untuk udang ukuran larva dan awal *post larva*.



3. Lakukan fiksasi dengan penyuntikan menggunakan larutan fiksatif untuk udang besar/tokolan keatas (ukuran diatas 1 gram) atau *post larva* besar (> PL 20).
4. Injeksi *hepatopankreas* sebanyak dua atau tiga kali hingga rata sehingga warnanya berubah dari putih menjadi oranye; kemudian injeksi dengan fiksatif ke bagian *cephalotorax* ke bagian abdomen anterior dan kebagian abdomen posterior.
5. Rendam contoh dalam fiksatif pada suhu ruang selama 24 jam - 72 jam tergantung pada ukuran udang.
6. Setelah difiksasi, pindahkan contoh ke dalam *ethyl alcohol* 70% sehingga dapat disimpan dalam waktu lama.

## 6.2 Preparasi organ atau jaringan target

Organ atau jaringan untuk pemeriksaan IMNV adalah otot daging, ruas bagian punggung atau perut bagian belakang. Setiap organ target diambil 0.3 cm<sup>2</sup> – 0.5 cm<sup>2</sup> cuci air lalu dimasukkan ke dalam *cassette embedding*.

## 6.3 Dehidrasi, *clearing* dan *infiltrasi* organ atau jaringan (Proses ini dapat menggunakan *automatic* atau *manual tissue processor*)

### 6.3.1 Dehidrasi

Merupakan cara pengeluaran air dari jaringan dengan menggunakan alkohol bertingkat dimulai dari alkohol 70 % sampai 100 %. Apabila jaringan masih keruh pada proses *clearing*, maka proses dehidrasi harus diulang.

### 6.3.2 Clearing

Proses diatas kemudian dipindahkan ke *xylol* atau *chloroform* I (kesatu) selama 1,5 jam, lalu dipindahkan ke *xylol* II (kedua) atau *chloroform* II selama 1,5 jam, kemudian dipindahkan ke *xylol* III (ketiga) atau *chloroform* III (ketiga) selama 1,5 jam.

**CATATAN** *Clearing* bertujuan untuk menghilangkan bahan kimia dehidrasi sehingga contoh menjadi transparan dan bahan ini mempunyai sifat mampu menggantikan bahan kimia dehidrasi dan melarutkan parafin.

### 6.3.3 Infiltrasi

Contoh dipindahkan ke *soft* parafin cair I (kesatu) selama 1,5 jam, kemudian dipindahkan ke *soft* parafin cair II (kedua) selama 1,5 jam pada suhu 60 °C.

**CATATAN** *Infiltrasi* merupakan cara penyusupan parafin ke dalam jaringan contoh yang bertujuan untuk menggantikan *xylol* sehingga contoh tidak rusak pada waktu dilakukan pemotongan dengan mikrotom.

## 6.4 Blocking

Contoh organ atau jaringan diambil dan ditempatkan pada *paraffin mold* dengan posisi sesuai tujuan pemeriksaan kemudian ditambahkan *hard* parafin cair dan ditutup dengan *cassette embedding*. Selanjutnya dibekukan dan siap untuk dipotong dengan mikrotom. Sebelum dipotong dilakukan proses *trimming*.

## 6.5 Pemotongan organ atau jaringan

Pemotongan dilakukan menggunakan mikrotom dengan ketebalan irisan 4 µm - 5 µm. Hasil



pemotongan diregangkan pada slide yang dibasahi alkohol 70%, secara berhati-hati masukkan ke permukaan air pada *floating bath* yang bersuhu 42 °C - 45 °C. Selanjutnya dilakukan penempelan irisan pada gelas objek yang telah dibersihkan dengan etanol 70 %.

## 6.6 Pewarnaan jaringan dan sediaan preparat

### 6.6.1 Deparafinasi

Contoh sediaan (*slide*) yang akan diperiksa direndam dalam *xylo* I (kesatu) atau *chloroform* I (kesatu) selama 15 menit, kemudian dipindahkan dan direndam dalam larutan *xylo* II (kedua) atau *chloroform* II (kedua) selama 15 menit dan *xylo* III (ketiga) atau *chloroform* III (ketiga) 10 menit.

### 6.6.2 Rehidrasi

Air diberikan pada contoh jaringan dari etanol konsentrasi tinggi ke etanol konsentrasi rendah, dengan cara:

- Contoh direndam dalam etanol absolut I (kesatu) selama 10 menit lalu contoh dipindahkan dan direndam dalam etanol absolut II (kedua) selama 2 menit.
- Selanjutnya, dipindahkan dan direndam dalam etanol 95 % selama 5 menit, etanol 90 % selama 5 menit, etanol 70 % selama 3 menit dan dibilas dalam air keran mengalir selama 2 menit kemudian bilas kembali dengan akuades selama 3 menit.

### 6.6.3 Pewarnaan

Dalam pewarnaan ini dipergunakan teknik pewarnaan *hematoxylene* dan *eosin*. Contoh dipindahkan dan direndam dalam *hematoxylene* selama 1,5 menit kemudian dibilas dengan air keran mengalir selama 8 menit, lalu dipindahkan dan direndam dalam akuades selama 3 menit. Selanjutnya, direndam dalam *eosin* selama 30 menit sampai dengan 60 menit, hilangkan kelebihan eosin dengan *acid alcohol*.

### 6.6.4 Dehidrasi dan *clearing*

- Sediaan direndam dalam etanol 70 % selama 1 menit.
- Selanjutnya sediaan direndam dalam etanol 90 % selama 1 menit, etanol 95 % selama 1 menit, etanol 100 % I (kesatu) selama 1 menit, etanol 100 % II (kedua) selama 1 menit, campuran etanol : *xylo* (1:1) selama 1 menit, *xylo* I (kesatu) atau *chloroform* I (kesatu) selama 3 menit, *xylo* II (kedua) atau *chloroform* II (kedua) selama 5 menit, *xylo* III (ketiga) atau *chloroform* III (ketiga) selama 5 menit.

### 6.6.5 Mounting

Angkat sediaan lalu dibersihkan sekelilingnya kemudian ditetesi dengan *entellan*, tutup dengan *cover glass*.

**CATATAN** *mounting* merupakan proses perekatan gelas penutup dengan zat perekat supaya sediaan jaringan tidak rusak.

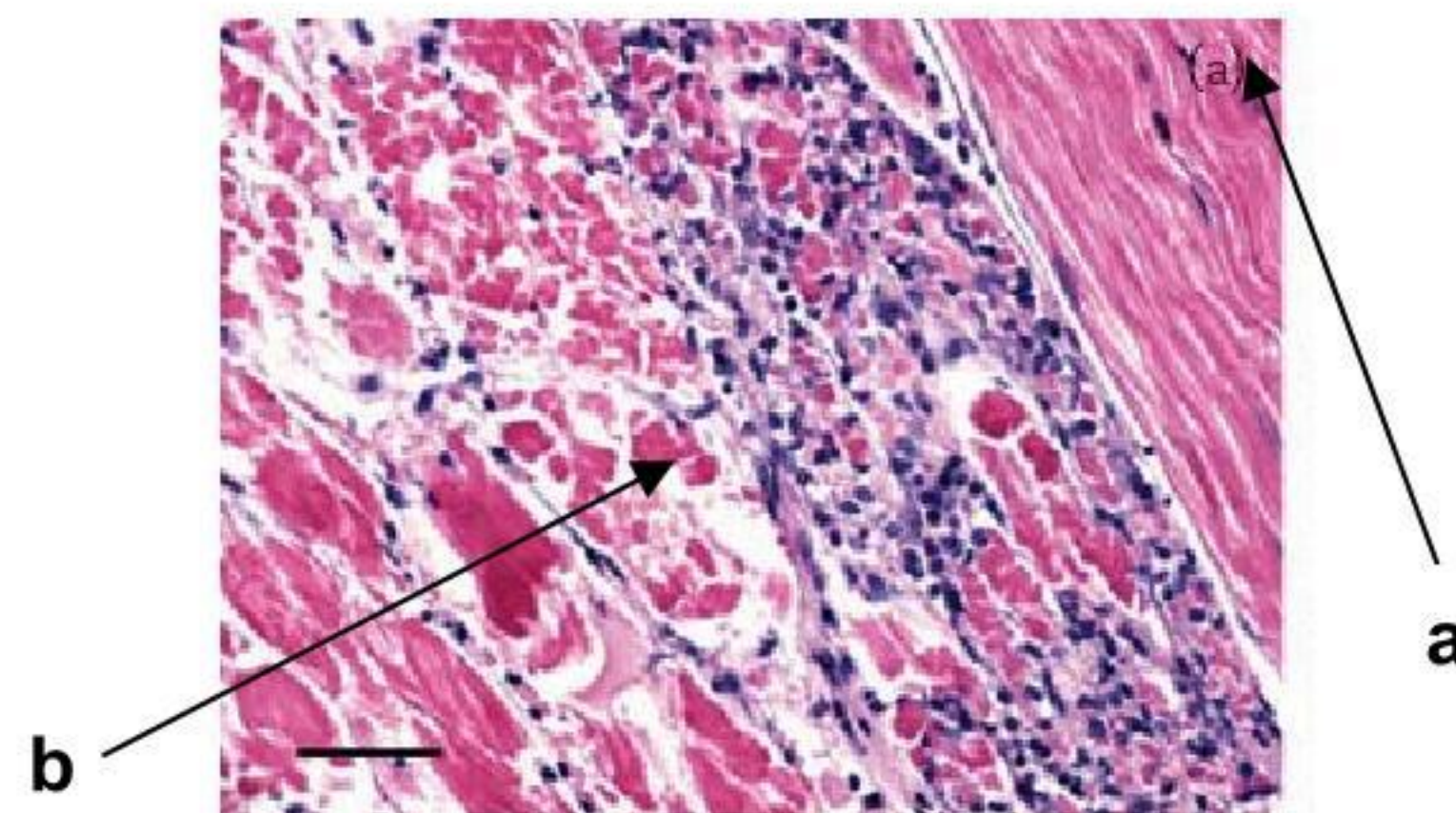
## 7 Interpretasi hasil

- Secara histopatologis, udang yang terserang IMNV akut menunjukkan kerusakan otot (*myonecrosis*) koagulatif, kadang disertai edema sesuai Gambar 1.



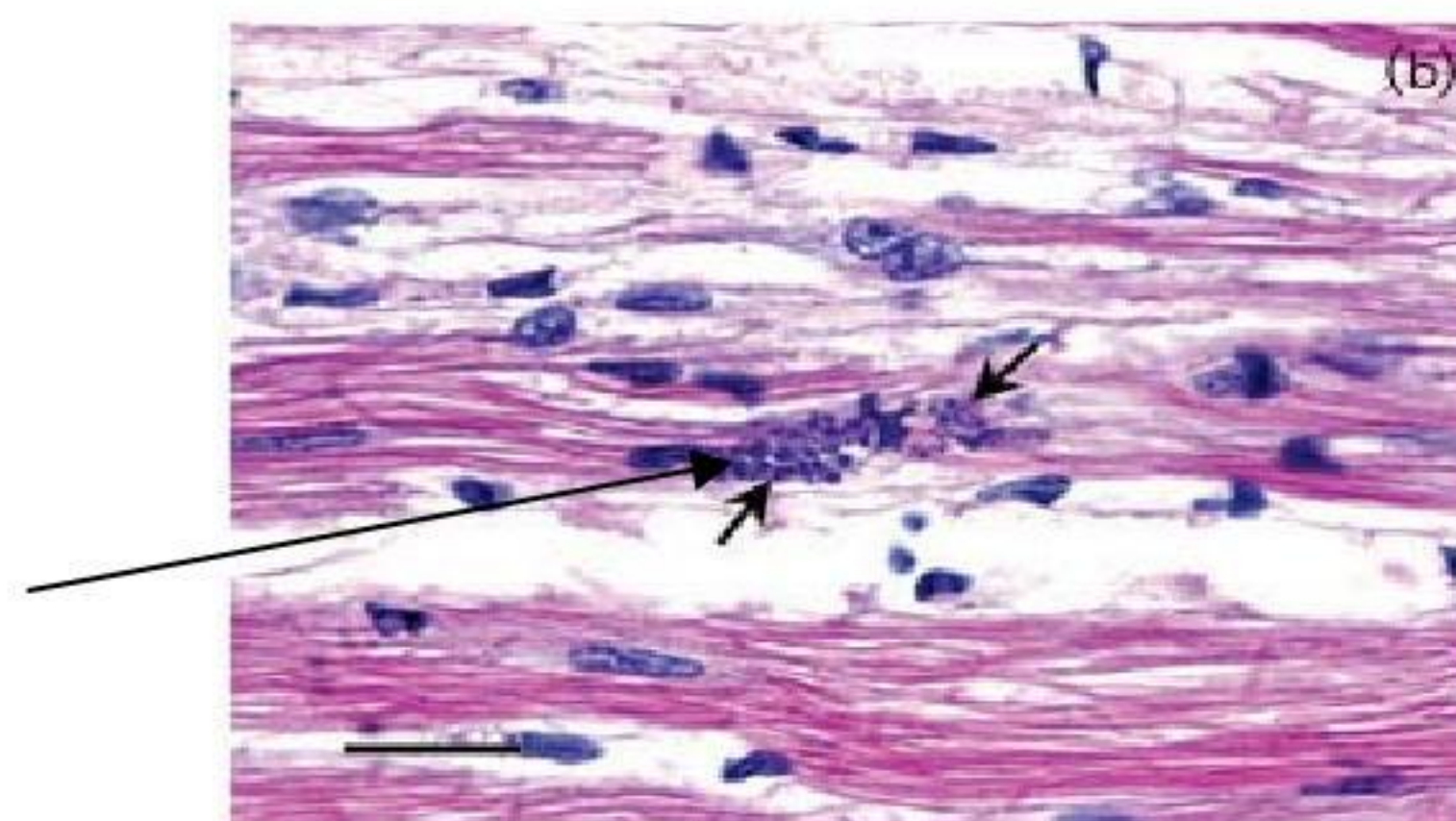
- IMNV kronis ditunjukkan dengan perubahan jenis kerusakan otot dari *myonecrosis* koagulatif menjadi *myonecrosis* likuifatik, diikuti dengan *infiltrasi* hemosit dan pembentukan jaringan ikat (*fibrosis*) sesuai Gambar 2.
- Pembentukan *spheroid* sel organ limfoid sering ditemukan di *hemocoel* dan jaringan ikat lunak terutama di lumen dan sekitar tubulus kelenjar *antennal*.

a. Nekrosis koagulatif jaringan



**Gambar 1 - Nekrosis koagulatif jaringan, disertai infiltrasi sel darah dan fibrosis (b), sebagai pembanding, dapat dilihat jaringan normal (a) di pojok atas kanan. Pewarnaan H&E, ukuran bar (garis patokan pengukuran dalam gambar) 50 mikrometer ( $\mu\text{m}$ )**

b. Badan inklusi



**Gambar 2 - Badan inklusi berwarna biru muda sampai biru tua jelas terlihat di tepi inti sel jaringan, lihat panah. Pewarnaan H&E, ukuran bar 20 mikrometer ( $\mu\text{m}$ )**



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Pembuatan pereaksi**

**A.1 Pembuatan larutan eosin**

Cara membuat:

**a. Pembuatan larutan stok eosin**

– eosin y	1 g
– akuades	100 ml

**b. Pembuatan larutan eosin yang siap digunakan**

– larutan stok eosin	35 ml
– etanol 80%	110 ml
– phloksin 1%	5 ml
– asam asetat glacial	1,5 ml

**A.2 Pembuatan larutan hematoxylene**

– hematoxylene crystal	2,5 g
– etanol absolut (95 %)	50 ml
– ammonium alum atau potassium alum	50 g
– akuades	500 g
– mercurie oxida	1,5 g
– asam asetat glacial	20 ml

Cara membuat:

- Larutkan *hematoxylene* dalam etanol absolute.
- Larutkan ammonium alum atau potassium alum dalam akuades.
- Campurkan a dan b, didihkan.
- Tambahkan merkuri oksida, dinginkan pada air es.
- Nukleus akan terwarnai dengan baik bila pada larutan ditambahkan asam asetat.
- Saring dengan kertas saring.

**A.3 Pembuatan larutan buffer netral formalin 10 %**

– fomaldehyda 37 %	100 ml
– akuades	900 ml
– natrium dihidrogen difosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	4 g
– natrium fosfat	6 g

Cara membuat:

Campurkan semua bahan di atas.



**A.4 Pembuatan larutan *Bouin's***

- |  |                |
|--|----------------|
| – asam pikrat jenuh, yang dilarutkan dengan akuades sampai jenuh | 750 ml         |
| – formalin 37 % - 40 %   | 250 ml         |
| – asam asetat glasial  | 50 ml – 100 ml |

Cara membuat:

Buat stok larutan asam pikrat jenuh dengan akuades, kemudian ambil 750 ml dan tambahkan formalin 37 % - 40 % sebanyak 250 ml. Terakhir tambahkan asam asetat glasial 50 ml.

**A.5 Pembuatan etanol 70 %**

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| – etanol absolute (p.a) | 700 ml |
| – akuades               | 300 ml |

Cara membuat:

Campurkan etanol absolute (p.a) ke dalam akuades dengan perbandingan 70 : 30

**A.6 Pembuatan etanol 90 %**

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| – etanol absolute (p.a) | 900 ml |
| – akuades               | 100 ml |

Cara membuat:

Campurkan etanol absolute (p.a) ke dalam akuades dengan perbandingan 90 : 10

**A.7 Pembuatan etanol 95%**

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| – etanol absolute (p.a) | 950 ml |
| – akuades               | 50 ml  |

Cara membuat:

Campurkan alkohol absolute (p.a) ke dalam akuades dengan perbandingan 95 : 5

**A.8 Pembuatan larutan *Davidson***

- |                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| – etanol absolut                    | 330 ml |
| – <i>formaldehyde</i> (36 % - 38 %) | 220 ml |
| – asam asetat glasial               | 115 ml |
| – akuades                           | 335 ml |

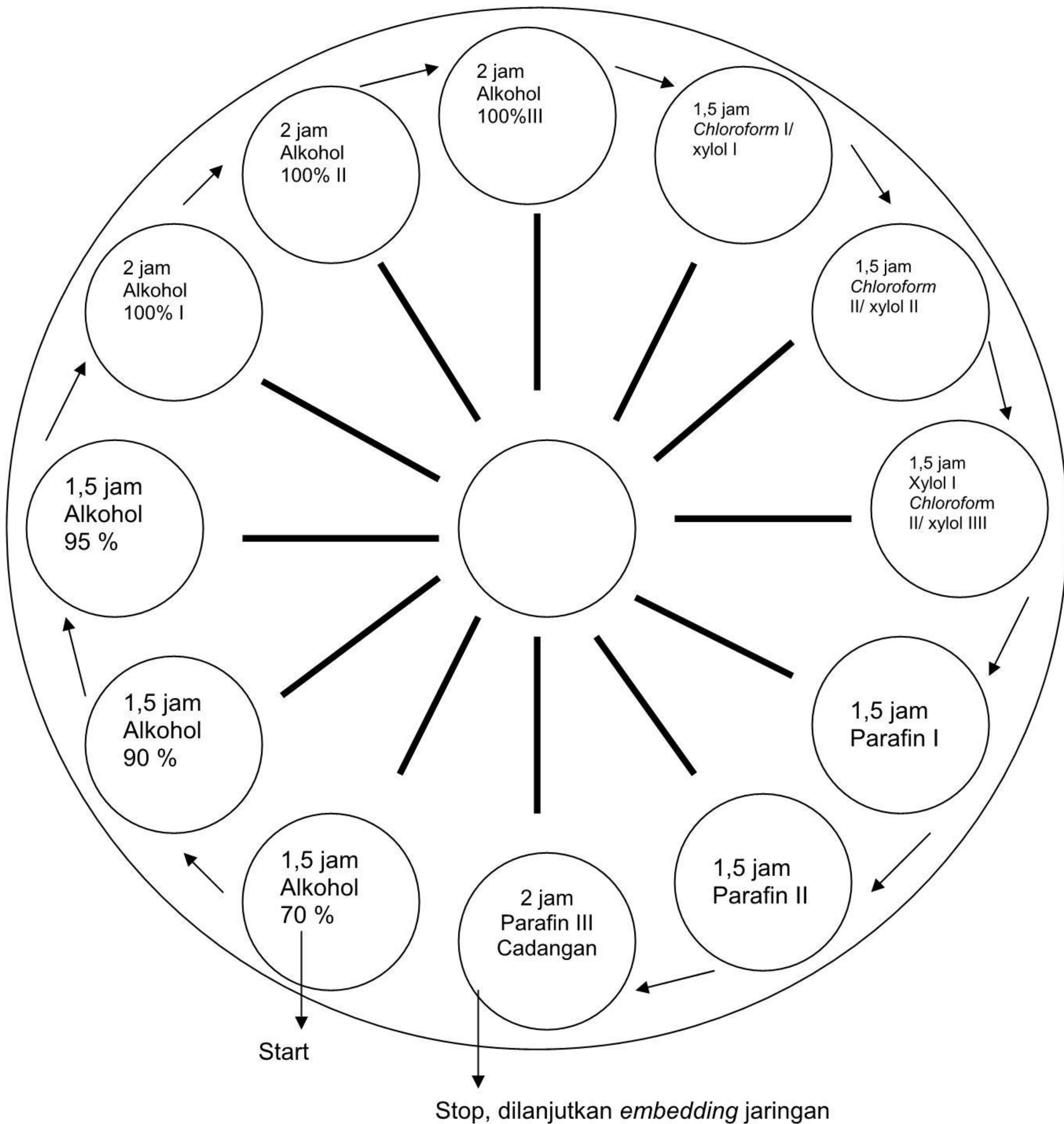
Cara membuat :

Larutkan formulasi di atas menjadi satu kemudian baru digunakan.



Lampiran B  
(informatif)

Diagram alir dan bahan kimia yang diperlukan dalam proses jaringan pada *automatic tissue processor*



Gambar B.1 - Diagram alir dan bahan untuk proses jaringan pada *automatic tissue processor*. Proses dehidrasi (dari etanol 70% s.d etanol 100%), proses *clearing* (dari xylol I /chloroform I s.d xylol III/chloroform III), dan proses infiltrasi parafin (dari parafin I s.d parafin terakhir)



**Lampiran C**  
(informatif)  
**Prosedur pewarnaan hematoxylene - eosin**

– xylol I	15 menit
– xylol II	15 menit
– xylol III	10 menit
– alkohol absolut I	10 menit
– alkohol absolut II	10 menit
– alkohol 95 %	5 menit
– alkohol 90 %	5 menit
– alkohol 70 %	3 menit
– air mengalir ( <i>tap water</i> )	2 menit
– akuades (DW)	3 menit
– <i>hematoxylene</i> ( <i>delafield</i> )	50 detik - 1 menit, ( <i>mayer</i> ) = 1,5 menit
– air mengalir ( <i>tap water</i> )	8 menit
– akuades (DW)	3 menit (sampai warna biru hilang)
– eosin	30 menit
– alkohol 70 %	1 menit
– alkohol 90 %	1 menit
– alkohol 95 %	1 menit
– alkohol absolut I	1 menit
– alkohol absolut II	1 menit
– alkohol <i>xylene</i>	1 menit ( <i>alkohol : xylene</i> =1:1)
– xylol I	3 menit
– xylol II	5 menit
– xylol III	5 menit
– <i>cover</i> .	

**CATATAN** alkohol 70 % dan 90 % setelah *eosin* jangan diganti atau warna tetap merah.



## Bibliografi

Kathy F. J. Tang\*, Carlos R. Pantoja, Bonnie T. Poulos, Rita M. Redman, & DV. Lightner., 2005, In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental *Infection With Infectious Myonecrosis Virus* (IMNV). Dis Aquat Org. 63 :

Poulos B.T & DV Lightner. 2006. *Detection of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) of Penaeid Shrimp by Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*.

Poulos, B.T., K.F.J. Tang, C.R. Pantoja, J.R. Bonami and D.V. Lightner. 2006. *Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp*. *Journal of General Virology* 87 : 987 - 996.

Pusat Karantina Ikan. 2008. *Metode Standar Pemeriksaan Hama dan Penyakit Ikan Karantina Golongan Virus*.



















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)